

University of Groningen

Centrosomes and cellular stress responses

Hut, Henderika Magrietha Janet

IMPORTANT NOTE: You are advised to consult the publisher's version (publisher's PDF) if you wish to cite from it. Please check the document version below.

Document Version

Publisher's PDF, also known as Version of record

Publication date:

2005

[Link to publication in University of Groningen/UMCG research database](#)

Citation for published version (APA):

Hut, H. M. J. (2005). *Centrosomes and cellular stress responses*. s.n.

Copyright

Other than for strictly personal use, it is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

The publication may also be distributed here under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license. More information can be found on the University of Groningen website: <https://www.rug.nl/library/open-access/self-archiving-pure/taverne-amendment>.

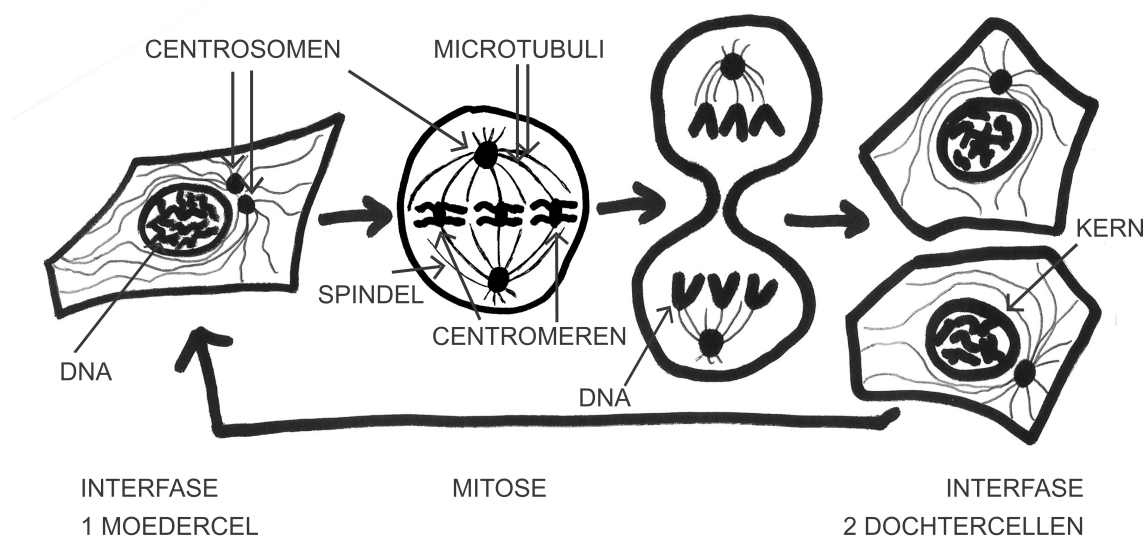
Take-down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Downloaded from the University of Groningen/UMCG research database (Pure): <http://www.rug.nl/research/portal>. For technical reasons the number of authors shown on this cover page is limited to 10 maximum.



Het centrosoom ligt in de cel net buiten de celkern en coördineert de groei van 'microtubuli'; dit zijn draden die, onder andere, de vorm van de cel bepalen en het mogelijk maken dat er transport (van bijvoorbeeld eiwitten) plaats kan vinden door de cel heen. Het centrosoom bestaat uit twee kleine cilinders, de 'centriolen', die omgeven worden door vele eiwitten. Het centrosoom verdubbelt precies één keer per cel cyclus en dit gebeurt tijdens de interfase. In figuur 1 is een schematische weergave hiervan te zien. Tijdens de S fase wordt het DNA verdubbeld en als dit gebeurd is, gaan de centrosomen (nu dus twee per cel) elk naar een andere kant van de kern en coördineren de organisatie van veel nieuwe microtubuli. De cel komt nu in de delingsfase, de 'mitose'. De microtubuli groeien rondom vanuit het centrosoom tot ze verankeren aan 'centromeren', de aangrijpingspunten op het DNA. Zo vormen ze een mitotische spindel met twee polen. De centrosomen trekken met behulp van de microtubuli het verdubbelde DNA uit elkaar. Er ontstaan dan twee dochtercellen, elk met één kern met één set van het DNA en één centrosoom, beide identiek aan de oorspronkelijke moeder cel. In figuur 2 is een schematische weergave van de celdeling gegeven.



Figuur 2. Schematische weergave van celdeling.

Zoals het hier nu beschreven is, gebeurt het onder normale omstandigheden. Echter, er zijn ook gebeurtenissen die allerlei vormen van schade geven aan de moleculen en structuren van een cel. Zo wordt elke cel regelmatig blootgesteld aan 'genotoxische stress', dat wil zeggen dat er beschadigingen in het DNA ontstaan. Dit kan door exogene factoren, zoals (zonne)straling of door endogene factoren, zoals fouten gemaakt bij het DNA verdubbelen. Om geen blijvende fouten in het DNA te laten ontstaan heeft de cel een aantal beschermingsmechanismen ontwikkeld. Ten eerste kan de cel, op verschillende momenten in de cel cyclus, progressie naar de volgende fase tijdelijk tegenhouden. Dit wordt geregeld via zogenaamde 'cel cyclus checkpoints', controle punten die in de gaten houden of de cel aan de volgende fase van de cel cyclus kan beginnen. Bijvoorbeeld, als het DNA nog niet volledig verdubbeld is, zorgt een bepaald checkpoint mechanisme ervoor dat de cel nog niet verder gaat naar de delingsfase, dus nog niet in mitose gaat. De cel heeft dan tijd het DNA alsnog volledig te verdubbelen en daarna zal de cel cyclus hervat worden. Ten tweede heeft de cel herstel mechanismen. Er zijn verschillende DNA schade herstel mechanismen, omdat er veel soorten beschadigingen in het DNA kunnen ontstaan. Deze variëren van het ontbreken van stukken DNA, tot het verkeerd verdubbeld zijn van DNA en het ontstaan van breuken in het DNA. Ten derde bestaat er een beschermingsmechanisme dat niet de cellen zelf beschermt, maar wel het weefsel of het organisme. Als de schade bijvoorbeeld te erg is, dan gaat de cel in 'apoptose'. Dit is een geprogrammeerde celdood, oftewel zelfmoord. Cel

cyclus checkpoints, DNA schade herstel mechanismen of de apoptose functioneren niet of minder goed wanneer er 'mutaties', fouten, zijn opgetreden in genen die coderen voor eiwitten die van belang zijn voor deze mechanismen.

Een andere vorm van cellulaire stress is 'proteotoxische stress', waarbij de vorm van de eiwitten in de cel verandert zodat de eiwitten makkelijk aan elkaar gaan klonteren. De bekendste vorm van proteotoxische stress is warmte behandeling. Er is weinig bekend over checkpoint mechanismen die de celdeling stopzetten na beschadigingen door warmte behandeling. Wel zijn er herstel mechanismen die beschadigingen door warmte behandeling kunnen voorkomen dan wel repareren. Namelijk, door de warmte behandeling worden er 'heat shock eiwitten' aangemaakt die helpen met het voorkomen van eiwit 'misvouwingen' en het herstellen van vervormde eiwitten, zodat deze niet aan elkaar gaan klonteren. Deze klonten in de cel kunnen namelijk in de weg zitten zodat ze de voortgang van de celdeling vertragen of laten mislukken. Net als na genotoxische stress kan de cel ook zelfmoord plegen wanneer de schade door proteotoxische stress te erg is om te kunnen repareren.

Voordat dit project begon, hebben andere onderzoekers reeds experimenten uitgevoerd met embryo's van de fruitvlieg, *Drosophila melanogaster*, en is gebleken dat bepaalde eiwitten van het centrosoom verdwenen nadat cellen met beschadigd DNA toch in mitose kwamen, dat wil zeggen wanneer de cel cyclus checkpoints en DNA schade herstel mechanismen niet (volledig) hadden gewerkt. Door de verdwijning van eiwitten van het centrosoom functioneerden de centrosomen niet meer: ze werden geïnactiveerd. De celdeling werd niet voltooid en het beschadigde DNA werd niet uit elkaar getrokken. Hierdoor werden de kernen met beschadigd DNA losgemaakt en 'weggegooid' in het binnenste van het embryo. Op die manier worden kernen met beschadigd DNA niet verder gebruikt voor de ontwikkeling van het embryo tot fruitvlieg. Dit hele proces van geïnactiveerde centrosomen is afhankelijk van het eiwit Chk2. Het Chk2 zit normaal op de centrosomen van het embryo en wanneer het Chk2 er niet is, vindt de beschreven reactie van de centrosomen niet plaats.

Het doel van dit proefschrift was om te onderzoeken of er wellicht ook in zoogdiercellen een mechanisme zou zijn dat centrosomen beïnvloedt in respons op genotoxische of proteotoxische stress. Een tweede doel was te onderzoeken in hoeverre de celdeling beïnvloed wordt als er abnormale centrosomen aanwezig zijn. De meeste kankercellen hebben abnormale of teveel centrosomen en een volgend doel was te kijken of er een mogelijke relatie bestaat tussen het ontstaan van abnormale centrosomen en het ontstaan van kanker.

Om dit te bestuderen werd er genotoxische stress geïnduceerd in zoogdiercellen, en werden deze cellen behandeld met checkpoint remmers om de activiteit van de reguliere cel cyclus checkpoints tegen te gaan. Hierdoor kwamen cellen in de mitose met beschadigd of niet volledig verdubbeld DNA. Als reactie op de aanwezigheid van onvolledig verdubbeld DNA tijdens de mitose splitsten de centrosomen en veranderde de mitotische spindel met twee polen naar een spindel met vier polen. Elk centrosoom was gespleten en bevatte nu één centriole in plaats van twee centriolen. Verbazingwekkend genoeg gingen deze cellen, in tegenstelling tot *Drosophila* embryo's, wel door met delen. Als gevolg hiervan werden meer dan twee dochtercellen gevormd en in andere gevallen klaptten de dochtercellen ineen tot één grote cel met meerdere kernen (hoofdstuk 2). Door de abnormale centrosomen werden dus dochtercellen gevormd, die niet exact één set DNA en niet exact één (compleet) centrosoom hadden. Als reactie op door straling beschadigd DNA tijdens de mitose splitsten de centrosomen niet, maar klaptten de dochtercellen wel ineen tot één grote cel met twee kernen. Opmerkelijk was dat deze grote cellen door een volgende (abnormale) celdeling konden gaan, waarna dochtercellen ontstonden met veel kernen en centrosomen (hoofdstuk 3). Er was dus wel een respons van centrosomen op de aanwezigheid van genotoxische stress tijdens de mitose, maar dit leidde niet tot het inactiveren van centrosomen zoals in fruitvliegembryo's. Hoewel het aannemelijk is dat deze dochtercellen op den duur dood zullen gaan, is het mogelijk dat een klein percentage van deze abnormaal gedeelde cellen blijft leven en doorgaat met delen. Dit zouden op den duur tumorcellen kunnen worden, want het fenomeen om én een verkeerde set DNA én een verkeerd aantal centrosomen te hebben, is zeer representatief voor tumorcellen.

Het inactiveren van centrosomen in fruitvliegembryo's, waardoor de celdeling niet voltooid werd en kernen met beschadigd DNA opgeruimd worden, is afhankelijk van de aanwezigheid van het eiwit Chk2. Door andere onderzoekers was beschreven dat in zoogdiercellen het eiwit Chk2 ook op de centrosomen aanwezig is. Helaas hebben deze andere onderzoekers waarschijnlijk te snel geconcludeerd dat Chk2 een centrosoom eiwit is (hoofdstuk 4) en het blijkt dat er nog geen conclusies kunnen worden getrokken of Chk2 ook in zoogdiercellen direct van belang is voor een centrosoom reactie op DNA schade. Een ander eiwit waarvan andere onderzoekers hebben gesuggereerd dat dit een centrosoom functie zou hebben is het eiwit BRCA1. Eerder is bewezen dat BRCA1 een belangrijke rol speelt bij DNA schade herstel en bij checkpoint regulatie. Ook is het zo dat veel cellen die geen BRCA1 hebben, abnormale centrosomen laten zien. Deze gegevens samen suggereren de volgende hypothese dat, als het BRCA1 afwezig is of aangetast is, dit zou leiden tot niet goed functionerende centrosomen en dus tot mislukte celdelingen en mogelijk tot tumorontwikkeling. Echter, in dit proefschrift worden experimenten weergegeven die aangeven dat het BRCA1 niet op de centrosomen zit (hoofdstuk 3), en dus zou de afwezigheid van BRCA1 niet direct leiden tot abnormale centrosomen en celdelingen. Verder laten we zien dat de abnormale centrosomen in BRCA1-/- cellen waarschijnlijk het gevolg zijn van een defect checkpoint controle mechanisme en een defect DNA schade herstel mechanisme. Kortom, er bestaat een correlatie tussen het missen van eiwitten nodig voor checkpoint mechanismen of DNA schade herstel en het aanwezig zijn van abnormale centrosomen, maar een directe evidentie voor een rol voor eiwitten als Chk2 en BRCA1 in centrosoom controle ontbreekt.

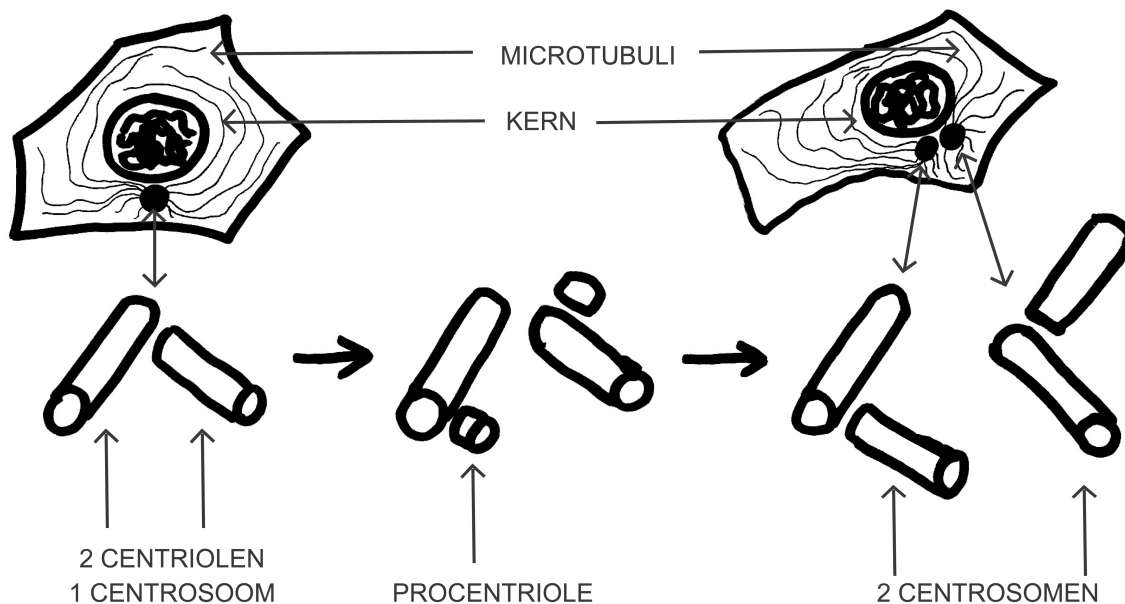
Het was al bekend dat na een warmte behandeling (proteotoxische stress) de misvormde eiwitten zich ophopen bij de centrosomen in de cel, maar het was nog niet onderzocht of dit direct tot mislukte celdelingen zou leiden. Onze data laten nu zien dat cellen, die tijdens de mitose een warmte behandeling ondergaan, abnormale celdelingen vertonen. Naarmate de warmte behandeling heviger was, dat wil zeggen met hogere temperaturen en langere behandeling, traden er meer en erger mislukte celdelingen op. Bij de hevigste warmte behandeling leek er zelfs celdood tijdens die mitose plaats te vinden, ook wel een 'mitotische catastrofe' genoemd. Van de behandelde cellen die normaal bleven delen, duurde de mitose langer dan normaal. Waarschijnlijk moesten eerst misvormde eiwitten opgeruimd of hersteld worden, voordat de centrosomen hun werk konden afmaken en het DNA uit elkaar konden trekken. Na een warmte behandeling nemen na enkele uren het aantal heat shock eiwitten, 'chaperonnes', toe waarvan wordt verondersteld dat ze zijn aangemaakt door de cel om de cel te beschermen voor verdere proteotoxische stress. Deze 'chaperonnes' kunnen aan misvormde eiwitten binden en hiermee voorkomen dat de misvormde eiwitten aan elkaar gaan kleven. Ook kunnen ze, in samenwerking met andere 'chaperonnes' misvormde eiwitten hervormen of afbreken, waarna de cel weer normaal kan functioneren. Wanneer één van deze 'chaperonnes', Hsp70, kunstmatig in grote hoeveelheden in de cel werd gebracht vóór de warmte behandeling, nam het percentage cellen dat normaal bleef delen sterk toe. Het Hsp70 ging direct na de warmte behandeling naar de centrosomen. Meteen nadat Hsp70 van de centrosomen verdween, ging de cel verder met delen en werden twee normale dochtercellen gevormd (hoofdstuk 5). Deze data wijzen erop dat Hsp70 de centrosomen na warmte behandeling tegen het samenklonteren van eiwitten kon beschermen en daarmee werd de functie van de centrosomen behouden, waarna de kans op een normale celdeling sterk toenam.

Dus, in zoogdiercellen is wel een respons aanwezig van centrosomen op genotoxische of proteotoxische stress, in die zin dat centrosomen splitsen en slechter functioneren, maar celdeling vindt onder deze omstandigheden vaak wel plaats en dit heeft dus grote gevolgen voor de dochtercellen. Wij hebben ook laten zien dat, in principe, een teveel aan centrosomen of slecht functionerende centrosomen kunnen ontstaan in elke willekeurige cel, die toch in de celdelingfase terecht is gekomen doordat checkpoint mechanismen niet functioneerden of doordat het DNA schade herstel slecht verliep. Tumorcellen kenmerken zich door het hebben van slechte DNA schade herstel mechanismen en door het hebben

Nederlandse Samenvatting

Naam promovendus:	Drs. H.M.J.Hut
Voorlopige promotiedatum:	12-10-2005
Promotor:	Prof. Dr. H.H. Kampinga
Copromotor:	Dr. O.C.M. Sibon
Titel proefschrift:	Centrosomen en cellulaire stress responsen

Ons lichaam is opgebouwd uit miljoenen cellen die in groepen de organen en weefsels vormen en ervoor zorgen dat alles functioneert zoals het zou moeten functioneren. Sommige weefsels bestaan uit cellen die niet of nauwelijks delen. Andere weefsels bestaan uit cellen die zich constant moeten verdubbelen, omdat het weefsel groter wordt of omdat er andere cellen doodgaan en vervangen moeten worden. Delende cellen doorlopen een cel cyclus die uit vier fasen bestaat: de G_1 fase, S fase, G_2 fase (deze drie fasen vormen samen de interfase) en de delingsfase, die ook wel mitose wordt genoemd. In de kern van elke cel ligt het 'DNA', het erfelijk materiaal, ook wel het genoom genoemd. Het DNA bestaat uit verschillende genen, die coderen voor specifieke eiwitten met elk een eigen functie. Tijdens de S fase wordt het DNA verdubbeld en tijdens de mitose wordt dit verdubbelde DNA uit elkaar getrokken en over twee dochtercellen verdeeld. Beide dochtercellen krijgen zo identiek DNA. De deling van een cel wordt sterk gecontroleerd, maar soms treden er verkeerde celdelingen op waardoor de cellen zich vervolgens, na vele stappen, zouden kunnen ontwikkelen tot tumorcellen. Een bepaald organel in de cel, het 'centrosoom', heeft een belangrijke rol bij het goed verlopen van celdelingen en dit proefschrift gaat over dit centrosoom en zijn reactie op verschillende soorten schade, 'stress', in de cel.



Figuur 1. Schematische weergave van de verdubbeling van het centrosoom.

Het centrosoom bestaat uit twee kleine cilinders, de 'centriolen'. Bij de verdubbeling in de interfase ontstaat eerst aan elk van de twee oude centriolen een nieuwe centriole, 'procentriole'. Deze twee procentriolen nemen in lengte toe tot ze even groot zijn als de twee oude centriolen. Daarna worden de twee oude centriolen gescheiden en ontstaan er twee nieuwe centrosomen, elk weer bestaande uit twee centriolen.

van niet functionerende cel cyclus regulatie. Hiermee kan men dus ook verklaren waarom in veel tumorcellen abnormale centrosomen gevonden worden.

Samenvattend, uit onderzoek met *Drosophila* embryo's was gebleken dat in de fruitvlieg centrosoom inactivatie een actief mechanisme is en een mechanisme waarin specifieke genen een rol spelen. Echter, er zijn in dit proefschrift geen aanwijzingen verkregen dat de centrosoom veranderingen in zoogdiercellen als reactie op cel stress komen door een actief mechanisme en er zijn geen genen geïdentificeerd die deze centrosoom respons in zoogdiercellen reguleren. Een ander verschil is dat in *Drosophila* embryo's kernen met abnormale centrosomen geëlimineerd worden en dus niet schadelijk meer zijn voor het zich ontwikkelende organisme, terwijl in zoogdiercellen er geen aanwijzingen zijn dat cellen met abnormale centrosomen opgeruimd worden en dus in theorie wel schadelijk zouden kunnen zijn voor het organisme. Een teveel aan centrosomen zou dan ook tumorontwikkeling kunnen versnellen aangezien deze cellen vaak op abnormale wijze delen. Om zeker te weten of cellen met teveel centrosomen werkelijk schadelijk kunnen zijn voor zoogdieren moeten experimenten gedaan worden waarin zoogdiercellen voor een langere tijd gevolgd worden in levende organismen.
